

# Veränderungen von Milchproteinen durch Einwirkung von Carbonylverbindungen

## II. Mitteilung

Veränderungen an Membranproteinen  
von schaum- und sprühgetrockneter Vollmilch bei der Lagerung\*

J. SCHORMÜLLER, E. GRAMPP\*\* und H.-D. BELITZ

Mitteilung aus dem Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie  
der Technischen Universität Berlin\*\*\*

Eingegangen am 24. Juli 1967

Bei der Herstellung und Lagerung von Trockenmilch treten Wertminderungen in verschiedener Richtung auf, die schon lange bekannt sind. Sie wirken sich einmal ernährungsphysiologisch aus, da durch ablaufende Reaktionen essentielle Aminosäuren geschädigt werden können und so der biologische Wert der Milchproteine gemindert wird. Daneben kommt es häufig zu unerwünschten Geschmacksveränderungen („stale flavor“). Schließlich sind noch physikalische Veränderungen, herabgesetzte Löslichkeit, Farbabweichungen zu beobachten. Das Ausmaß dieser Veränderungen ist weitgehend von den Trocknungsbedingungen abhängig. So ist es zu verstehen, daß die „klassischen Trocknungsarten“ (Walzen- und Sprühtrocknung), durch neue Verfahren, z. B. durch die Schaum-Matten-Trocknung [SINNAMON (1) und HANRAHAN (2)] weitere Entwicklung erfuhren. Vorteile der Schaumtrocknung (Verkürzung des Trocknungsvorganges, schonende Verfahrensführung, weitgehende Erhaltung des genuinen Milchcharakters, gute Rekonstituierbarkeit) stehen Nachteile gegenüber, vor allem eine erhöhte Lageranfälligkeit, bedingt durch höhere Enzymaktivitäten und durch die große Oberfläche des Pulvers.

Wir haben hier aus der Vielzahl möglicher Umsetzungen, die Veränderungen an den Membranproteinen von Milchpulvern unterschiedlicher Herstellung herausgegriffen. Diese Membranproteine dürften aufgrund ihrer räumlichen Nachbarschaft zu den Lipiden bevorzugte Reaktionspartner für Carbonylverbindungen aus der Lipidoxydation sein. Es war deshalb anzunehmen, daß Veränderungen an dieser Proteinfraction besonders empfindliche Indikatoren für Umsetzungen im Milchpulver sind. Methodisch konnten wir uns dabei auf die Untersuchungen über Reaktionen zwischen Casein und Äthanal stützen (3).

### Experimentelles

#### 1. Milchpulver

a) ein sprühgetrocknetes Vollmilchpulver (VMP I)<sup>1</sup>. Die Aufarbeitung erfolgte 6–10 Tage nach der Herstellung.

\* Auszug aus der Promotionsarbeit von E. GRAMPP: „Lagerungsbedingte Reaktionen der Membranproteine schaum- und sprühgetrockneter Vollmilch mit Carbonylverbindungen“. Diss. Techn. Univ. Berlin 1966 (D 83).

\*\* Enzym-Laboratorium der Fa. Röhm & Haas, Darmstadt.

\*\*\* Diese Untersuchung wurde teilweise durch eine Beihilfe des United States Department of Agriculture unter P. L. 480 finanziert. Für die großzügige Unterstützung danken wir verbindlich.

<sup>1</sup> Die Proben wurden uns von der AFICO AG, Lausanne/Schweiz zur Verfügung gestellt. Die Herstellung geschah nach U. S. P. 3.065.076 (angem. 3. 9. 1959).

b) ein schaumgetrocknetes Vollmilchpulver (VMP II)<sup>1</sup>. Das Pulver wurde in verlöteten Blechdosen unter N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> geliefert, die außerdem einen Pt-Katalysator enthielten.

Die Lagerung von VPM I und VMP II erfolgte in großen Petrischalen in einem Klimaschrank über 37 Tage bei 30° C und 30% relativer Luftfeuchtigkeit.

### 2. Isolierung der Membranproteine

Je 335 g Vollmilchpulver wurden in 2500 ml Wasser (Fettgehalt 3%) von 40° C über 60 min leicht gerührt. Anschließend wurden durch dreimaliges Zentrifugieren bei 40° C und 4200 U/min über 10 und 30 min drei Sahnefraktionen abgetrennt.

Die Sahnefraktionen wurden nach jeder Zentrifugation vorsichtig abgehoben und mit einer 3% igen Saccharoselösung so lange gerührt, bis eine homogene Lösung erhalten wurde. Diese Waschung wurde mehrmals wiederholt, wobei die Sahne jeweils durch Zentrifugation bei 40° C und 3000 U/min von der Waschflüssigkeit abgetrennt wurde. Die letzte Waschung erfolgte mit Wasser. Die gewaschenen Sahnefraktionen wurden dann mit Alkohol/Äther entfettet. Die zurückbleibenden Membranproteine wurden über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> im Vakuum getrocknet. Die einzelnen Fraktionen werden wie folgt bezeichnet:

Membranproteine aus VMP I, ungelagert: P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> (entsprechend den Sahnefraktionen 1, 2 und 3)

Membranproteine aus VMP I, gelagert: SP<sub>1</sub>, SP<sub>2</sub>, SP<sub>3</sub>.

Membranproteine aus VMP II, ungelagert: USP<sub>1</sub>, USP<sub>2</sub>, USP<sub>3</sub>.

Membranproteine aus VMP II, gelagert: SUSP<sub>1</sub>, SUSP<sub>2</sub>, SUSP<sub>3</sub>.

### 3. Analytische Methoden

a) Fettbestimmungen in Sahnefraktionen erfolgten nach RÖSE-GOTTLIEB (4).

b) Stickstoff- und Phosphorbestimmungen in den Membranproteinen erfolgten nach Veraschung mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photometrisch nach der modifizierten Ninhydrinmethode von MOORE und STEIN (5) bzw. nach FISKE und SUBBAROW (6).

c) Die Chromatographie der Membranproteine an DEAE-Cellulose erfolgte nach YAGUCHI (7) in der beschriebenen Weise (3). Zu Vergleichszwecken wurden die Gesamtproteine aus frischer Magermilch und aus VMP I in gleicher Weise aufgetrennt.

Die Proben wurden auf folgende Weise für die Chromatographie vorbereitet:

Magermilch wurde 4 Tage bei 3° C gegen 0,02 m-Phosphatpuffer pH 7 dialysiert. Das Dialysat wurde für die Trennung eingesetzt.

4 g VMP I wurden 60 min mit 100 ml Alkohol und nach Zugabe von 100 ml Äther weitere 60 min gerührt. Der Rückstand wurde abfiltriert, mit Alkohol/Äther gewaschen und über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. 400 mg des entfetteten Pulvers wurden in 50 ml Veronalpuffer pH 8,0 (J: 0,1) aufgenommen und nach 4-tägiger Dialyse gegen 0,02 m-Phosphatpuffer pH 7 chromatographiert.

Je 50 mg Membranprotein wurden in 20 ml 0,05 m KCl unter Zugabe einiger Tropfen n-NaOH gelöst und 3 Tage gegen 0,02 m-Phosphatpuffer pH 7 dialysiert. Die erhaltene Lösung wurde auf die Säule gegeben.

d) Die folgenden Methoden wurden in der bereits beschriebenen Weise (3) auf die Membranproteine angewendet: Elektrophorese in Polyacrylamidgel, Gelfiltration, Hydrolyse mit Trypsin, Reaktion mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol.

### Ergebnisse

Das folgende Schema zeigt den Verlauf der Zentrifugation zur Gewinnung der Sahnefraktionen am Beispiel von VMP I.

In Tab. 1 sind Fett- und Proteingehalt der gewaschenen Sahnefraktionen zusammengestellt.

In den Sahnefraktionen 1—3 liegen zunehmend kleinere Fetttröpfchen vor. Die relative Vergrößerung der Tröpfchenoberfläche, im Verhältnis zum Volumen drückt sich im Absinken des Fett:Protein-Verhältnisses aus.

Aus Tab. 2 geht hervor, daß die Membranproteine aus den verschiedenen Sahnefraktionen deutliche Unterschiede im N/P-Verhältnis aufweisen. Sie wurden deshalb bei allen Milchpulvern getrennt untersucht.

<sup>1</sup> Wir erhielten die Proben von United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Eastern Utilization Research and Development Division, Washington 25, D. C., USA [zur Herstellung vgl. HANRAHAN (2)].

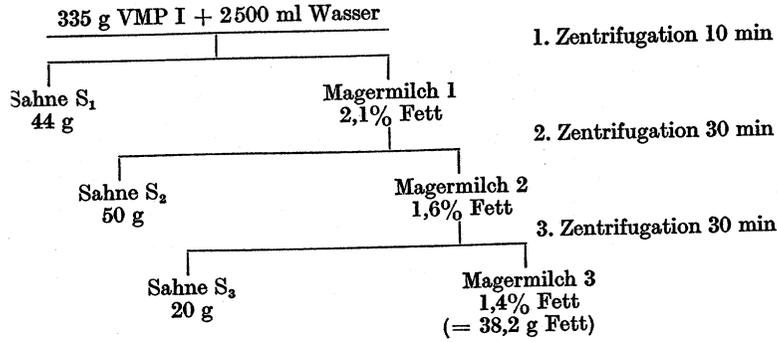


Tabelle 1. Fett- und Proteingehalt der gewaschenen Sahnefraktionen aus VMP I

Sahnefraktion	Fett in g	Protein in g	Fett/Protein
1	11,8	0,45	26,2
2	4,7	0,33	14,3
3	1,6	0,15	10,7

Tabelle 2. Stickstoff- und Phosphorwerte der Membranproteine aus VMP I

Membranprotein	N in %	P in %	Mol-Verhältnis N:P
P <sub>1</sub>	11,9	1,31	20,1
P <sub>2</sub>	12,3	1,39	19,7
P <sub>3</sub>	12,4	1,44	19,0

Das chromatographische Verhalten der Proteine von frischer homogenisierter Vollmilch und von Sprüh-Vollmilchpulver (VMP I) an DEAE-Cellulose ist in Abb. 1 wiedergegeben. Der weitgehenden Differenzierung bei Frischmilch steht das wesentlich einfachere Chromatogramm von VMP I gegenüber. Die Hauptmenge an Protein wird in einem Peak eluiert. Ähnliche Unterschiede sind bei den Membranfraktionen P<sub>1</sub> (aus Sprühpulver VMP I) und USP<sub>1</sub> (aus Schaumpulver VMP II) zu beobachten (Abb. 2 und 3). Hier ist die Differenzierung bei der Fraktion USP<sub>1</sub> aus dem unter schonenden Bedingungen hergestellten VMP II größer als bei der entsprechenden Fraktion P<sub>1</sub> aus VMP I. Lagerung führt in beiden Fällen (SP<sub>1</sub> und USP<sub>1</sub>) zu einer weiteren Vereinfachung des Bildes. Nicht so ausgeprägt sind die Unterschiede bei der Elektrophorese in Polyacrylamidgel (Abb. 4).

Bei den Membranproteinen aus den gelagerten Milchpulvern (SP<sub>3</sub> und SUSP<sub>3</sub>) ist eine Verbreiterung der Startzone und eine geringere anodische Wanderung entsprechender Banden gegenüber den Proteinen aus nicht-gelagerten Milchpulvern (P<sub>3</sub> und USP<sub>3</sub>) festzustellen.

Die Gelfiltration an Sephadex G 200 ergab kleinere K<sub>a</sub>-Werte für alle gelagerten Produkte (Tab. 3). Die Molekulargewichte wurden aus einer Eichkurve entnommen,

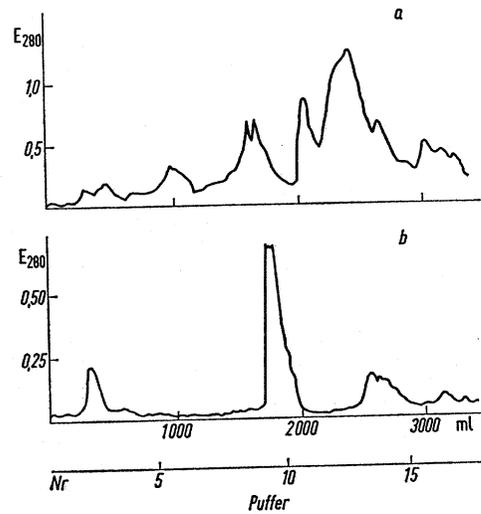


Abb. 1a u. b. Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose. a) frische, homogenisierte Vollmilch, b) VMP I

die nach Angaben von DETERMANN u. GELOTTE (8) aufgestellt wurde. Mit allen untersuchten Membranfraktionen wurde nur ein Proteinpeak erhalten. Die lagerungsbedingte Molekulargewichtserhöhung ist bei den Membranproteinen aus dem

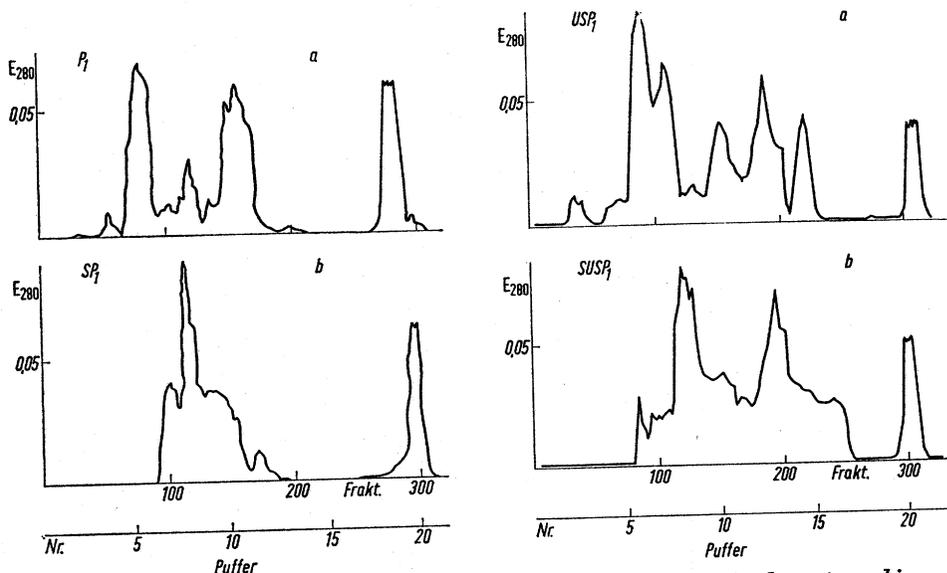


Abb. 2a u. b. Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose. a) P<sub>1</sub>, b) SP<sub>1</sub>

Abb. 3a u. b. Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose. a) USP<sub>1</sub>, b) SUSP<sub>1</sub>

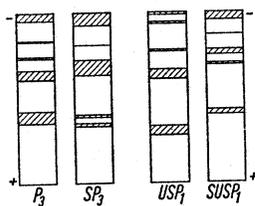


Abb. 4. Elektrophorese von Proteinen an Polycrylamid-gel. Puffer: Veronal; pH 8,9; J/2=0,05; 4,8 m-Harnstofflösung; 20 V/cm; 45 min

schaumgetrockneten Milchpulver (USP<sub>1</sub>—USP<sub>3</sub>) wesentlich größer als bei den Proben P<sub>1</sub>—P<sub>3</sub> aus sprühgetrocknetem Milchpulver, und zwar liegt sie zwischen 8% und 19% bei den P-Fractionen, zwischen 36% und 62% bei den USP-Fractionen. Offensichtlich besteht auch eine Beziehung zwischen der durchschnittlichen Größe der Fetttröpfchen und den Veränderungen der entsprechenden Membranfraktionen. Nach Tab. 1 sind die Membranfraktionen P<sub>3</sub> und USP<sub>3</sub> den kleinsten Fetttröpfchen zuzuordnen. Bei diesen Fraktionen ist die beobachtete Molekulargewichtserhöhung nach der Lagerung am größten.

Tabelle 3. Gelfiltration an Sephadex G 200. K<sub>a</sub>-Werte und Molekulargewichte der Membranfraktionen

Proteinfraktion	K <sub>a</sub>	Mol.-Gew. 10 <sup>-3</sup>	Proteinfraktion	K <sub>a</sub>	Mol.-Gew. 10 <sup>-3</sup>	Erhöhung d. Mol.-Gew. in %
P <sub>1</sub>	0,23	150	SP <sub>1</sub>	0,19	171	14
P <sub>2</sub>	0,19	171	SP <sub>2</sub>	0,17	185	8
P <sub>3</sub>	0,19	171	SP <sub>3</sub>	0,15	204	19
USP <sub>1</sub>	0,23	150	SUSP <sub>1</sub>	0,15	204	36
USP <sub>2</sub>	0,23	150	SUSP <sub>2</sub>	0,13	223	48
USP <sub>3</sub>	0,23	150	SUSP <sub>3</sub>	0,11	244	62

In Tab. 4 sind die für die Hydrolyse von Membranproteinen mit Trypsin bestimmten Werte der Michaeliskonstanten und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit zusammengestellt. Bei den Proteinen  $P_1$ – $P_3$  aus sprühgetrocknetem Milchpulver nimmt  $K_M$  durch die Lagerung ab; bei den Proteinen  $USP_1$ – $USP_3$  aus schaumgetrocknetem Milchpulver ist dagegen eine Zunahme zu verzeichnen. Umgekehrt verhalten sich die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten.

Tabelle 4. Hydrolyse von Membranproteinen mit Trypsin. Michaeliskonstanten ( $K_M$ ) und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (als maximale Extinktion,  $E_{max}$  bei 280 nm)

Proteinfraktion	$K_M$ mg/ml	$E_{max}$
$P_1$	5,18	2,35
$P_2$	4,50	2,48
$P_3$	4,44	2,27
$SP_1$	4,28	2,33
$SP_2$	3,56	2,02
$SP_3$	3,69	2,03
$USP_1$	4,40	1,98
$USP_2$	3,84	2,10
$USP_3$	3,23	1,69
$SUSP_1$	4,82	2,80
$SUSP_2$	4,57	2,58
$SUSP_3$	3,96	2,23

Die Anzahl der in tryptischen Hydrolysaten durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie trennbaren Peptide wird durch die Lagerung herabgesetzt, wie in Abb. 5 am Beispiel von  $P_1$  und  $SP_1$  gezeigt wird.

In Tab. 5 sind die bei den verschiedenen Proteinfraktionen aus gelagerten und nicht-gelagerten Milchpulvern erhaltenen Werte für Lysin und für die Reaktion mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol zusammengefaßt.

Da es sich bei den DNP-Resten überwiegend um  $\epsilon$ -DNP-Lysinreste handeln wird, ist die Anzahl der DNP-Reste ein Maß für die Anzahl reaktionsfähiger Lysinreste in den einzelnen Proteinfraktionen.

Die Zahl der durch Aminosäureanalyse erfassbaren Lysinreste ist bei den Membranproteinen aus sprühgetrocknetem ( $P_1$ – $P_3$ ) und schaumgetrocknetem ( $USP_1$  bis  $USP_3$ ) Milchpulver praktisch gleich. Große Unterschiede bestehen dagegen in der Zahl der zur Reaktion mit FDNB befähigten Reste: Sie liegt bei den Proteinen aus sprühgetrocknetem Pulver zwischen 13 und 14, bei den Proteinen aus schaumgetrocknetem Pulver zwischen 31 und 58.

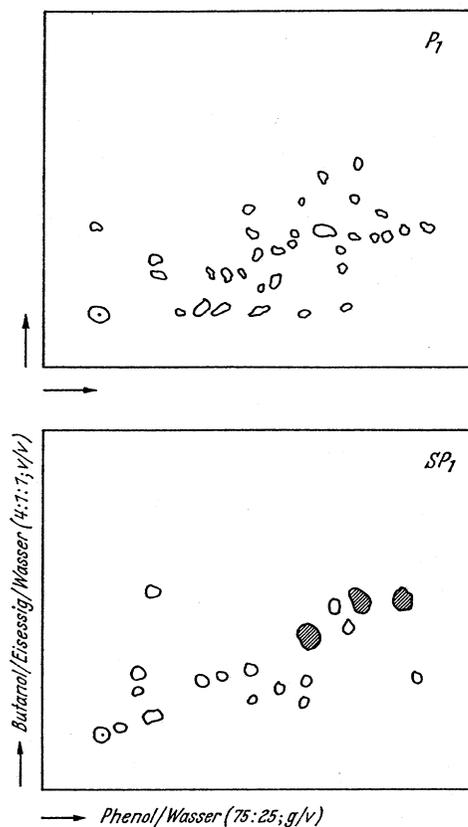


Abb. 5. Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung der tryptischen Hydrolysate von  $P_1$  und  $SP_1$ . Träger: Kieselgel

Tabelle 5. Lysin- und DNP-Reste der Proteinfraktionen aus VMP I und VMP II vor und nach der Lagerung (Werte in Resten pro 10<sup>5</sup> g Protein)

Proteinfraktion	Lysin <sup>1</sup>	DNP-Reste <sup>2</sup>	Proteinfraktion	Lysin <sup>1</sup>	DNP-Reste <sup>2</sup>
P <sub>1</sub>	70	14,3	SP <sub>1</sub>	63	14,0
P <sub>2</sub>	70	13,9	SP <sub>2</sub>	62	13,2
P <sub>3</sub>	68	13,1	SP <sub>3</sub>	59	13,0
USP <sub>1</sub>	71	58	SUSP <sub>1</sub>	67	36
USP <sub>2</sub>	70	39	SUSP <sub>2</sub>	63	34
USP <sub>3</sub>	69	31	SUSP <sub>3</sub>	68	29
GP I <sup>3</sup>	57	19,5	SGP I <sup>4</sup>	58	13,7
GP II <sup>5</sup>	74	38	SGP II <sup>6</sup>	69	28

<sup>1</sup> Werte aus Aminosäureanalysen. <sup>2</sup> Gemessen nach Reaktion mit FDNB; Methode von BATTERSBY und CRAIG (9). <sup>3</sup> Gesamtprotein von VMP I. <sup>4</sup> Gesamtprotein von VMP I nach Lagerung. <sup>5</sup> Gesamtprotein von VMP II. <sup>6</sup> Gesamtprotein von VMP II nach Lagerung.

Lagerung führt bei allen untersuchten Fraktionen zu einer Abnahme der Lysinreste zwischen 5% und 13%. Die Zahl der DNP-Reste ändert sich bei P<sub>1</sub>–P<sub>3</sub> kaum. Bei den USP-Fraktionen nimmt sie dagegen ab, besonders stark bei USP<sub>1</sub>.

### Diskussion

Die Ergebnisse zeigen zunächst, daß zwischen den Membranproteinfraktionen von sprühgetrocknetem und schaumgetrocknetem Milchpulver Unterschiede bestehen. Diese Unterschiede kommen sowohl im chromatographischen Verhalten entsprechender Fraktionen als auch in der Anzahl der durch Reaktion mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol erfaßbaren NH<sub>2</sub>-Gruppen zum Ausdruck. Aus den erhaltenen Werten folgt, daß die untersuchten Proteine — im Vergleich zur Frischmilch — bei der Schaumtrocknung weniger starken Veränderungen unterliegen als bei der Sprühtrocknung. Dagegen wirkt sich die Lagerung über 37 Tage bei 30° C auf die Proteine des schaumgetrockneten Pulvers viel stärker aus. Großen Veränderungen im chromatographischen Bild bei der Trennung an DEAE-Cellulose entsprechen deutliche Erhöhungen der durch Gelfiltration bestimmten Molekulargewichte und starke Abnahme der mit FDNB reagierenden Gruppen. Beim sprühgetrockneten Pulver sind auch meßbare Veränderungen vorhanden, aber bei weitem nicht so ausgeprägt. Es ist aufgrund dieser Ergebnisse zu erwarten, daß die herstellungsbedingten Unterschiede im Verhalten der untersuchten Proteinfraktionen aus Sprühmilchpulver mit zunehmender Lagerzeit immer kleiner werden.

Insgesamt sind die verwendeten analytischen Methoden gut geeignet zur Erfassung der Veränderung an Proteinen unter Lagereinflüssen. Eine Aussage über die Reaktionen, die zu diesen Veränderungen führen, ist bei einem so komplexen System wie Milchpulver schwer zu machen. Da bei der Reaktion zwischen Casein und Äthanal aber gleichsinnige Veränderungen am Protein beobachtet wurden (3), ist zu schließen, daß auch bei den lagerungsbedingten Veränderungen an Membranproteinen aus Milchpulvern Reaktionen dieser Proteine mit Carbonylverbindungen aus der Fett-oxidation eine Rolle spielen.

### Zusammenfassung

Mit Hilfe einer geeigneten Zentrifugiertechnik wurden aus frischen und gelagerten Milchpulvern unterschiedlicher Herstellung (Sprühtrocknung und Schaumtrock-

nung) Membranproteine isoliert. Diese Proteine wurden mit verschiedenen analytischen Methoden (Chromatographie an DEAE-Cellulose, Gelfiltration, Elektrophorese in Polyacrylamidgel, Hydrolyse mit Trypsin, Reaktion mit Fluordinitrobenzol) untersucht. Es wurden deutliche Unterschiede zwischen entsprechenden Fraktionen aus sprühgetrocknetem und schaumgetrocknetem Milchpulver beobachtet. Diese herstellungsbedingten Differenzen wurden bei der Lagerung kleiner, da die Membranproteine aus schaumgetrocknetem Milchpulver in wesentlich stärkerem Ausmaß lagerungsbedingte Veränderungen zeigten.

#### *Summary*

By a suitable centrifugation technique membrane protein fractions were isolated from whole milk, and from newly produced and stored spray-dried whole milk and foam-dried whole milk. The obtained fractions were analyzed by several methods, including chromatography on DEAE-cellulose, gel-filtration, electrophoresis in polyacrylamide-gel, hydrolysis with trypsin and reaction with fluorodinitrobenzene.

There were significant differences between the membrane proteins from spray-dried and from foam-dried whole milk, the latter being closer related to the fractions from fresh whole milk. On the other side storage of the products (37 days at 30 °C) causes much more changes in the analytical behaviour of the fractions from foam-dried whole milk in comparison with the fractions from spray-dried whole milk.

The changes of the membrane proteins during storage are similar to changes in casein, observed after treatment with ethanal.

Therefore it is possible, that these changes of the membrane proteins are also caused by reactions with carbonyl compounds from fatty acid oxidation.

#### **Literatur**

1. SINNAMON, H. J., N. C. ACETO, R. K. ESKEN u. E. F. SCHOPPET: *J. Dairy Sci.* **40**, 1036 (1957).
2. HANRAHAN, F. P., A. TAMMSMA, K. K. FOX u. M. J. PALLANSCH: *J. Dairy Sci.* **45**, 27 (1962).
3. SCHORMÜLLER, J., E. GRAMPP u. H.-D. BELTZ: *Diese Z.* **136**, 271 (1968).
4. SCHWARZ, G.: *Milchwiss.* **9**, 95 (1954).
5. MOORE, S., u. W. H. STEIN: *J. biol. Chem.* **211**, 907 (1954).
6. UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS u. J. F. STAUFFER: *Manometric techniques and tissue metabolism*. S. 190. Minneapolis, Minn.: Burgess Publ. 1951.
7. YAGUCHI, M., N. P. TAR-ASSUK u. H. G. HUNZIKER: *J. Dairy Sci.* **44**, 589 (1961).
8. DETERMANN, H., u. B. GELOTTE: Gelfiltration. In: *Biochemisches Taschenbuch*. 2. Aufl., Bd. II, S. 905—913, daselbst S. 910. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.
9. BATTERBY, A. R., u. L. CRAIG: *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 4023 (1952).